

Interestérification enzymatique régiosélective 1-3 en milieu fondu et en réacteur continu : valorisation de l'huile de palme

J. M. MUDERHWA (1), M. PINA (1), D. MONTET (1), P. FEUILLARD (1) et J. GRAILLE (1)*

Résumé. — La mise en œuvre de l'interestérification enzymatique régiosélective 1-3 dans un réacteur tubulaire à lit catalytique fixe rempli de Lipozyme (lipase fixée de *Mucor miehei*), fait suite à la mise au point de la réaction en « batch », elle constitue la phase finale de l'étude du biofaçonnement des huiles végétales par interestérification enzymatique en milieu fondu catalysée par les lipases régiosélectives 1-3. La cinétique de la réaction montre une transformation complète en 5 h de séjour dans le réacteur avec conservation de la régiosélectivité 1-3. Il est possible de partir de coupages huile de palme/contre-huile dans un rapport défini et de façonner ainsi des produits dont les propriétés sont fonction du débit du réacteur et de la composition du mélange initial ; on peut donc faire varier les propriétés des produits à souhait. L'objectif consistant à valoriser l'huile de palme, ou sa fraction concrète, par l'obtention soit de base grasse pour margarines sans huiles hydrogénées, soit d'huiles fluides pour l'assaisonnement et la friture, a été atteint.

INTRODUCTION

Le travail entrepris a été effectué dans le but de valoriser biologiquement la qualité commerciale et nutritionnelle de l'huile de palme et de sa fraction concrète par biofaçonnement réalisé par interestérification enzymatique, catalysée par des lipases régiosélectives 1-3 en milieu fondu. Cette valorisation vise deux principaux objectifs :

- concevoir des bases grasses pour margarines de table ou de pâtisserie, garanties sans huiles hydrogénées,

- produire des huiles fluides pour l'assaisonnement et la friture, éventuellement enrichies en acides gras essentiels, correspondant aux besoins technologiques et nutritionnels.

Du point de vue biotechnologique, le choix de l'enzyme la plus appropriée par sa spécificité et la facilité de sa mise en œuvre sont des critères essentiels. Ainsi, nous avons souligné par ailleurs les avantages de l'interestérification régiosélective 1-3 (I.R. 1-3) où, en particulier, seules les positions 1 et 3 des triglycérides sont modifiées, la position 2 plus riche en acides gras essentiels restant inchangée. Cet aspect revêt une importance capitale à l'égard du problème de l'huile de palme dont certaines perspectives d'amélioration n'ont pas donné à ce jour entière satisfaction (déshydrogénation chimique, méthodes agronomiques et mélanges eutectiques).

Concernant la structure glycéridique de cette huile, Faulkner *et al.* [1] ont montré que 90 % environ des acides gras saturés (essentiellement palmitique) occupent les positions externes du glycérol.

En conséquence, pour atteindre les objectifs fixés, l'I.R. 1-3 inter-huiles, catalysée par les lipases régiosélectives 1-3, a été étudiée en milieu fondu en utilisant comme huile de base l'huile de palme et/ou sa fraction concrète et comme contre-huiles les huiles suivantes : coprah, palmiste (huiles lauriques à propriétés de fusion intéressantes) ; colza (type oléique) ; *Myrianthus arboreus*, soja (type linoléique) ; son de riz (type oléique-linoléique) ; bourrache (type gamma linoléique).

Faisant suite à une première phase de sélection et de

production de lipases régiosélectives 1,3 [2, 3], puis à une étude comparative de l'activité des divers biocatalyseurs testés sous différentes formes [4, 5], le Lipozyme, lipase de *Mucor miehei* fixée sur résine macroporeuse échangeuse d'anions, a été choisi comme biocatalyseur de la réaction, notamment pour les raisons suivantes : la mise au point d'un test de détermination de l'activité spécifique de transestérification [6, 7] et l'étude de l'influence de l'activité de l'eau sur les milieux réactionnels [8] ont montré que le Lipozyme était le complexe enzymatique le plus actif parmi tous les biocatalyseurs testés, nous avons également vérifié que la régiosélectivité 1,3 était conservée pendant un temps compatible avec les durées des réactions industrielles [9].

Bien que ce biocatalyseur soit très cher (3 500 F/kg), il a cependant été retenu aussi pour ses propriétés physiques particulières : le diamètre des particules est supérieur à 200 µm, ce qui facilite son utilisation en continu dans un système sans solvant. De plus sa thermostabilité lui confère une demi-vie allant jusqu'à 1 600 h à 60 °C [10].

Une étude préliminaire en « batch » [11] nous a permis de connaître la cinétique de la réaction et de déterminer le temps pour lequel la réaction atteint l'équilibre. L'interestérification a été conduite avec des ratios huile de palme ou concret de palme/contre-huile de 20/80 à 80/20. La réaction à 60 °C pendant 6 h mettant en œuvre 6 g de couple huile de base/contre-huile et 0,3 g de Lipozyme, a montré que l'interestérification est totale. On a pu ainsi suivre l'allure des courbes de teneur en solides en fonction de la température pour chaque rapport huile/contre-huile. Ces courbes de teneur en solide ont été comparées à celles des margarines commerciales témoins fournissant des renseignements sur les mélanges présentant des propriétés rhéologiques intéressantes.

Dans la présente étude, seuls les rapports huile/contre-huile ayant donné des produits à propriétés rhéologiques désirées ont été retenus. On suivra systématiquement l'allure des courbes de teneur en solide en fonction de la température pour chaque temps de séjour dans le réacteur. Les produits qui auront les propriétés rhéologiques les plus intéressantes seront sélectionnés et proposés pour une étude plus détaillée avant de procéder aux tests industriels.

(1) Division Chimie des Corps gras, CIRAD-JRHO ; B.P. 5035 — 34032 Montpellier Cedex (France).

* Auteur à qui toute correspondance doit être adressée

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Bien que l'un des objectifs généraux de cette technique soit de mettre en œuvre des huiles brutes ou très sommairement raffinées, nous avons dans certains cas utilisé des huiles totalement raffinées. Quelquefois, il s'est avéré nécessaire de travailler avec des huiles purifiées sur colonne de silice. Ces exceptions ont été nécessaires pour rendre plus aisé le contrôle analytique. La lipase mise en œuvre est le Lipozyme fabriqué et commercialisé par Novo.

Conditions de réaction.

Un réacteur à lit catalytique fixe a été conçu : le réacteur est constitué d'une colonne « Pharmacia » à double enveloppe thermostatée maintenue à 60 °C. Le lit catalytique comprend 9 g de Lipozyme. Le mélange à interestérifier est maintenu à 60 °C \pm 1 °C dans un réservoir et admis dans le réacteur par la base à l'aide d'une pompe péristaltique Gilson. Le volume mort de la colonne, déterminée à l'aide de colorant « rouge à l'huile O » à 1 % (P/P) dans l'huile est de 17,6 ml. Les temps de séjour dans ce réacteur peuvent varier de 30 min à 5 h, ce qui correspond à des débits de 35,2 ml \cdot h⁻¹ à 3,52 ml \cdot h⁻¹.

Méthodes analytiques.

Les méthodes analytiques de contrôle de l'I.R. 1-3 à savoir, l'analyse des triglycérides par CPG en fonction du nombre d'atomes de carbone et par HPLC en fonction du nombre de partitions, la composition des acides gras en position interne et la teneur en solide des mélanges interestérifiés par RMN à basse résolution ont été détaillées précédemment [11].

RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'I.R. 1-3, effectuée en « batch » [11] entre l'huile de palme et le concret de palme et les huiles lauriques, a montré d'une

part que les mélanges suivants, totalement interestérifiés, palme/palmiste 80/20 et concret/palmiste dans les ratios 40/60, 50/50 et 60/40 présentent à 30 °C les mêmes teneurs en solide que la margarine ferme témoin et, d'autre part que les couples d'huiles suivants, totalement interestérifiés, palme/coprah 80/20, palme/palmiste 70/30 et concret/palmiste dans les ratios 20/80 et 30/70 sont caractérisés par un taux de solide à 30 °C comparable à celui de la margarine au tournesol frigo tartinable.

De même, l'interestérification entre l'huile de palme ou le concret de palme et les huiles fluides permet d'obtenir, à partir des mélanges palme/colza, palme/HSR, palme/soja, palme/bourrache dans le ratio 40/60 et concret/colza, concret/soja, palme/*Myrianthus*, palme/bourrache dans le rapport 30/70, des huiles fluides vers 20-25 °C et enrichies selon les cas en acides gras essentiels.

Ces mélanges présentent donc des propriétés intéressantes et certains d'entre-eux ont été étudiés en réacteur en effectuant des cinétiques. Mais les conditions de réaction ne sont pas les mêmes en continu et en « batch ». En effet, dans le réacteur, le lit catalytique de 32 cm de haut est constitué de 9 g de Lipozyme. Il s'avère donc nécessaire d'établir la cinétique de la réaction afin de déterminer le temps de contact nécessaire pour que la réaction atteigne l'équilibre. De plus, il est également nécessaire de vérifier si, dans ces conditions, le biocatalyseur conserve sa régiosélectivité 1-3 à l'égard du substrat c'est-à-dire si des migrations spontanées d'acyles n'ont pas lieu surtout pour des durées de réaction assez longues.

Cinétique de la réaction et détermination du temps à l'équilibre (T_{eq}).

Comme dans le cas de la réaction en réacteur discontinu, le couple d'huiles retenu pour cette étude est le suivant : palme/*Myrianthus* dans le ratio 60/40, car elles sont respectivement caractérisées par 25 % de POO et 35 % de POP

TABLEAU I. — Cinétique d'interestérification entre l'huile de palme et l'huile de *Myrianthus arboreus* (60/40)

(Les résultats sont exprimés en % pondéraux)

TG	Palme	<i>Myrianthus</i>	0	26 min	64 min	1 h 30	3 h 00	5 h 00
LLnLn		1,4		0,5	0,5	0,4	0,3	0,4
LLLn		0,5		0,4	0,3	0,3	0,2	0,2
LLL		79,9	31,1	28,3	26,0	23,8	21,8	21,0
OLL		12,8	4,8	5,4	5,9	6,3	7,8	7,8
PLL	1,0	2,7	1,7	3,0	5,6	7,4	8,9	9,0
OOL	1,0	0,7	1,2	1,8	1,6	2,2	3,3	3,3
StLL	—	1,6	0,8	1,0	0,9	1,0	1,1	1,1
POL	7,9	0,4	5,4	7,0	8,6	9,8	11,1	11,2
MyOO	0,5		0,4	0,2	0,2	—	—	—
PPL	7,2		4,5	5,1	5,0	5,0	5,3	5,3
MyPO	1,0		1,2	1,2	1,2	1,1	0,9	0,9
OOO	3,5		2,2	2,5	2,4	2,2	2,0	2,0
StOL	0,7		0,8	—	—	—	1,1	1,7
POO	25,1		14,9	14,7	14,4	13,7	11,7	11,7
PSIL	0,8		0,3	0,5	1,1	1,1	1,2	1,1
POP	35,2		20,7	19,1	17,6	17,2	15,6	15,9
PPP	9,5		5,5	4,7	3,8	4,5	4,0	4,0
PStO	5,5		3,4	3,1	3,5	3,0	2,7	2,8
PPSt	0,8		0,7	1,1	0,9	0,7	0,6	0,4
StStO	0,3		0,4	0,4	0,5	0,5	0,4	0,3

pour l'huile de palme et 80 % de LLL pour l'huile de *Myrianthus*. Ces triglycérides traceurs aident à suivre l'évolution de la réaction.

Des prélèvements de 5 g du mélange interestérifié sont effectués en fonction du temps pour un certain nombre de temps de séjour dans le réacteur. Ce temps de séjour varie de 30 min à 5 h et l'interestérification est contrôlée par HPLC en fonction des nombres de partitions des triglycérides. Les valeurs consignées dans le tableau I indiquent l'évolution des concentrations (% pondéraux) des divers triglycérides en fonction du temps de séjour dans le réacteur ; elles permettent de suivre la cinétique de l'interestérification en tenant compte des triglycérides principaux suivants : LLL, PLL, POL, POP et PPP.

La concentration des triglycérides LLL, POP et PPP diminue progressivement au cours de la réaction alors que celle des triglycérides POL et PLL augmente.

Il apparaît que l'interestérification est totale au terme d'un temps de 5 h, temps pour lequel la concentration de ces divers triglycérides n'évolue plus.

La concentration des triglycérides LLL et POP diminue de 32 et 27 % respectivement par rapport à la concentration initiale en valeur relative ; la teneur des triglycérides POL et PLL évolue de 5.4 à 11.2 % et de 1.7 à 9.0 % respectivement

En conséquence, l'interstérification en réacteur sera étudiée en effectuant des cinétiques pour des temps de séjour variant de 30 min à 5 h.

Etude de la stabilité de la régiosélectivité 1-3 du biocatalyseur.

Le mélange palme/*Myrianthus* (60/40) est interestérifié pour des temps de séjour dans le réacteur variant de 26 min à 5 h. Des prélèvements de 2 g de l'effluent sont effectués au cours de la réaction à la sortie du réacteur. Les différents effluents sont purifiés par chromatographie sur gel de silice. La composition en acides gras totaux des triglycérides du mélange non traité et la répartition interne/externes des acides gras des triglycérides sont déterminées. Les résultats obtenus, consignés dans le tableau II, suscitent les commentaires ci-après : en comparant la composition molaire moyenne des acides gras en position interne du mélange non traité à celle des mélanges interestérifiés entre 26 min et 5 h,

on constate que ces compositions sont pratiquement équivalentes ; la composition molaire moyenne des acides gras en position interne des triglycérides reste constante au cours de la réaction. La régiosélectivité 1,3 du Lipozyme est conservée et l'I.R. 1-3 se déroule convenablement puisque aucune migration d'acyles n'est constatée au cours de la réaction.

I.R. 1-3 avec les huiles lauriques.

Les couples d'huiles retenus pour cette transformation biologique sont les suivants : palme/coprah 70/30 et concret/palmiste 30/70. La réaction d'interestérification est effectuée pour des temps de séjour dans le réacteur variant respectivement de 30 min à 4 h et 35 min à 4 h 37 min. L'effluent du réacteur est contrôlé par RMN à impulsion à basse résolution.

Les valeurs de teneurs en solide en fonction de la température et du temps de séjour dans le réacteur sont données dans les tableaux II pour le couple palme/coprah (70/30) et IV pour le couple concret/palmiste (30/70) et peuvent être interprétées comme suit :

— les mélanges interstérifiés sont caractérisés par un taux de solide nettement inférieur à celui des mélanges respectifs non traités,

— la teneur en solide des mélanges interestérifiés varie avec le temps de séjour dans le réacteur, elle diminue progressivement au cours de la réaction d'interestérification ;
— la teneur en solide à 37 °C des mélanges interestérifiés oscille entre 0 et 2 % ; en particulier elle est nulle pour le couple palme/coprah 70/30 interestérifié pendant au moins 1 h ; elle atteint 2 % pour le mélange concret/palmiste 30/70 interestérifié au bout de 35 min et 0,37 % pour le même mélange traité au bout de 4 h 37 min.

Les teneurs en solides des mélanges interestérifiés ont été comparées à celles des produits de référence (margarine ferme et margarine frigo-tartinable au tournesol) (Tabl. V). En tenant compte uniquement des valeurs de teneurs en solide à 29, 30 et 37 °C, il apparaît dans ces conditions que :

1) Les mélanges palme/coprah (70/30) et concret/palmiste (30/70) interestérifiés pendant 30 min et 4 h 37 min respectivement sont comparables à la margarine frigo-tartinable au tournesol, les teneurs en solide à 30 °C étant respectivement

TABLEAU II. — Etude de la conservation de la régiosélectivité 1-3 du Lipozyme au cours de l'IR 1-3 en réacteur du mélange palme/*Myrianthus* (60/40)

Les résultats sont exprimés en % molaires par rapport à la totalité de l'acide gras dans le mélange

[illegible]

TABLEAU III. — Teneurs en solide (%) en fonction de la température du mélange palme/coprah (70/30) interestérifié en réacteur pour des temps de séjour variant de 30 min à 4 h

Température (°C)	Palme	Coprah	Palme/coprah 70/30				
			0	30 min	1 h	2 h	4 h
0	54,46	79,60	53,42	45,65	38,60	35,66	33,94
5	49,59	68,21	42,65	32,85	27,88	24,71	22,17
10	34,67	57,33	25,33	20,30	18,00	15,67	13,65
15	25,29	49,42	14,54	12,34	11,00	10,04	9,03
22	15,41	30,99	7,34	7,00	6,00	5,65	4,67
29	8,95	0,23	5,18	3,81	2,64	2,24	1,93
37	3,70	—	1,85	0,72	—	—	—
42	2,20	—	1,26	0,35	—	—	—
48	—	—	—	—	—	—	—

TABLEAU IV — Teneurs en solide (%) en fonction de la température du mélange concret/palmiste (30/70) interestérifié en réacteur pour des temps de séjour variant de 35 min à 4 h 37 min

Température (°C)	Concret	Palmiste	Concret/palmiste 30/70				
			0	35 min	63 min	2 h 04	4 h 37
0	66,04	70,52	64,70	62,99	60,35	58,08	56,51
5	62,73	66,67	54,75	52,44	50,30	49,43	46,05
10	53,30	60,63	43,36	41,33	37,67	38,67	34,60
15	45,00	53,35	34,43	31,70	29,82	26,91	23,98
22	33,39	40,74	23,30	21,50	18,59	17,20	15,80
29	23,65	3,30	8,46	6,42	4,89	3,60	2,84
37	14,00	—	3,03	2,03	1,00	0,90	0,37
42	8,30	—	2,45	0,47	0,09	—	—
48	2,66	—	—	—	—	—	—

TABLEAU V. — Teneurs en solide (%) des produits de référence et des mélanges concret/palmiste (30/70) et palme/coprah (70/30) interestérifiés

Temp (°C)	Margarine ferme	Margarine frigo tartenable	Concret/palmiste		Palme/coprah
			35 min	4 h 37	30 min
29	5,65	3,22	6,42	2,84	3,81
30	5,00	2,33	5,33	2,67	2,67
37	—	—	2,03	0,37	0,72

de 2,67 % et 2,33 %. Ces deux mélanges ont un taux très négligeable de solide à 37 °C, soit 0,72 % et 0,37 % respectivement ; par voie de conséquence, ce sont des bases grasses susceptibles de servir d'ingrédients dans la production des margarines de table ayant des propriétés rhéologiques voisines de la margarine au tournesol,

2) Le couple concret/palmiste (30/70) interestérifié pendant 35 min se rapproche de la margarine ferme témoin, les teneurs en solide à 30 °C étant respectivement de 5,33 % pour le produit et 5,00 % pour la margarine ferme : cependant ce mélange est caractérisé par un taux non négligeable de solide à 37 °C, soit 2,03 %.

En conséquence, il constitue une base grasse exploitable pour la confection des margarines de cuisson ou de pâtisserie.

Interestérification avec les huiles fluides.

L'étude en réacteur discontinu nous a permis de retenir, les couples d'huiles suivants : palme/colza 40/60, concret/soja 30/70 et palme/*Myrianthus* 60/40.

a) I.R. 1-3 avec l'huile de colza.

Le mélange palme/colza 40/60 est interestérifié pour des temps de séjour dans le réacteur variant de 35 min à 4 h. Les teneurs en solide en fonction de la température et du temps de séjour dans le réacteur sont consignées dans le tableau VI, on peut suivre ainsi l'évolution du % de solide du mélange interestérifié en fonction du temps de séjour dans le réacteur. Les résultats appellent les commentaires suivants :

— les mélanges interestérifiés présentent une teneur en solide inférieure à celle des mélanges non traités ;

— la teneur en solide des mélanges traités varie avec le temps de séjour dans le réacteur : elle diminue progressivement au cours de la réaction et devient nulle à 37 °C ;

— le couple palme/colza 40/60 interestérifié pour le temps de séjour dans le réacteur variant de 2 h à 4 h est pratiquement fluide à 20-25 °C ; les teneurs en solide à 22 °C sont respectivement de 0,92 % et 0,41 %.

b) I.R. 1-3 avec les huiles de soja et de *Myrianthus*.

Les couples d'huiles concret/soja (30/70) et palme/*Myrianthus* (60/40) sont interestérifiés pour des temps de séjour dans le réacteur variant de 35 min à 5 h et de 26 min à 5 h respectivement.

Les valeurs des teneurs en solide en fonction de la température et du temps de séjour dans le réacteur sont indiquées dans les tableaux VII pour le couple concret/soja (30/70) et VIII pour le couple palme/*Myrianthus* (60/40) ; les résultats s'interprètent comme suit :

— l'interestérification abaisse la teneur en solide des coupages ;

— la teneur en solide des mélanges interestérifiés varie naturellement avec le temps de contact comme dans les cas précédents ; il diminue au cours de la réaction ;

— le couple concret/soja 30/70 interestérifié pour des temps de séjour dans le réacteur, variant de 75 min à 5 h est

caractérisé par une teneur en solide nulle à 37 °C ; il en est de même du mélange palme/*Myrianthus* 60/40 interestérifié pour des temps de contact de 64 min à 5 h ;

— le mélange concret/soja 30/70 interestérifié durant 2 h 45 min et 5 h constitue une graisse plastique à température ambiante, le % de solide à 22 °C étant 1,83 % et 1,20 % respectivement. Il pourrait être utilisé en tant qu'ingrédient dans la production de « shortenings ». Il est de plus totalement fluide à 37 °C pour une réaction de 2 h 45 min.

Par contre, le couple palme/*Myrianthus* 60/40 est pratiquement fluide à température ambiante pour un temps de séjour de 5 h dans le réacteur, la teneur en solide à 22 °C est de 0,69 %.

c) Caractérisation des produits ayant des teneurs en solides intéressantes : composition des acides gras des mélanges et analyse des triglycérides par HPLC.

Seuls, les produits ayant 1,20 % et 0,69 % de solide à 22 °C seront caractérisés en effectuant par HPLC l'analyse de leurs triglycérides.

* Composition des acides gras des mélanges.

La composition des acides gras des mélanges concret/soja 30/70, palme/*Myrianthus* 60/40 et palme/colza 40/60 est contrôlée puis comparée à celle des triglycérides de l'huile de palme et du concret de palme.

Il est évident que comparativement à l'huile de palme, et au concret de palme, les mélanges concret/soja 30/70,

TABLEAU VI. — Teneurs en solide (%) en fonction de la température du mélange palme/colza (40/60) interestérifié en réacteur pour des temps de séjour variant de 35 min à 4 h

Température (°C)	Palme	Colza	Palme/colza 40/60				
			0	35 min	69 min	2 h 05	4 h
0	54,46	0,39	14,74	12,10	10,53	8,67	7,52
5	49,59	0,01	9,41	7,85	6,67	5,43	4,65
10	34,67	—	5,40	4,67	3,30	3,00	2,00
15	25,29	—	3,54	3,35	2,15	1,81	1,21
22	15,41	—	2,32	2,13	1,01	0,92	0,41
29	8,95	—	2,03	1,58	0,33	0,13	0,04
37	3,70	—	—	—	—	—	—
42	2,20	—	—	—	—	—	—
48	—	—	—	—	—	—	—

TABLEAU VII. — Teneurs en solide (%) en fonction de la température du mélange concret/soja (30/70) interestérifié en réacteur pour des temps de séjour variant de 35 min à 5 h

Température (°C)	Concret	Soja	Concret/soja 30/70				
			0	35 min	75 min	2 h 45	5 h 05
0	66,04	0,29	16,15	14,29	12,34	10,31	8,03
5	62,73	0,04	11,35	9,91	8,04	7,08	5,65
10	53,30	—	9,00	7,30	5,67	4,68	3,04
15	45,00	—	7,30	5,66	4,10	3,24	2,08
22	33,39	—	5,37	4,33	2,33	1,83	1,20
29	23,65	—	4,00	2,64	1,00	0,86	0,32
37	14,00	—	1,33	0,67	0,06	0,01	—
42	8,30	—	1,00	0,29	—	—	—
48	2,66	—	—	—	—	—	—

TABLEAU VIII. — Teneurs en solide (%) en fonction de la température du mélange palme/*Myrianthus* 60/40 interestérifié en réacteur pour des temps de séjour variant de 26 min à 5 h

Température (°C)	Palme	<i>Myrianthus</i>	Palme/ <i>Myrianthus</i> 60/40					
			0	26 min	64 min	1 h 30	3 h 00	5 h 00
0	54,46	0,01	25,30	23,85	20,11	18,76	15,70	14,36
5	49,59	—	19,38	17,69	15,67	12,92	10,86	8,59
10	34,57	—	13,00	11,36	9,32	8,30	6,30	5,00
15	25,29	—	9,37	7,34	5,70	5,33	4,00	3,05
22	15,41	—	5,67	4,34	3,00	2,36	1,30	0,69
29	8,95	—	2,32	1,30	0,33	0,14	—	—
37	3,70	—	1,00	0,33	—	—	—	—
42	2,20	—	0,01	—	—	—	—	—
48	—	—	—	—	—	—	—	—

TABLEAU IX. — Composition en triglycérides des mélanges concret/soja (30/70), palme/*Myrianthus* (60/40) et palme/colza (40/60) avant (T_0) et après (T_4 ; T_5) interestérification en réacteur. Détermination d'espèces de triglycérides

(Les résultats sont exprimés en % pondéraux)

TG	Concret/soja 30/70		Palme/ <i>Myrianthus</i> 60/40		Palme/colza 40/60	
	T_0	T_5	T_0	T_5	T_0	T_4
LLnLn	0,5	0,2	—	0,4	—	—
LLLn	5,4	0,2	—	0,2	0,2	0,2
OLnLn	—	—	—	—	0,3	0,3
LLL	13,2	11,4	31,1	21,0	2,2	0,5
OLLn	3,6	3,6	—	—	3,2	2,0
PLLn	2,2	2,6	—	—	0,5	0,7
OLL	12,4	12,0	4,8	7,8	6,1	4,7
OOLn	0,3	1,2	—	—	5,2	3,8
PLL	10,5	12,0	1,7	9,0	2,0	2,4
POLn	0,4	1,7	—	—	0,9	3,1
OOL	5,6	5,8	1,2	3,3	14,1	13,7
StLL	2,9	2,7	0,8	1,1	1,1	—
POL	7,5	10,7	5,4	11,2	6,7	12,9
MyOO	—	—	0,4	—	—	—
PPL	3,2	4,8	4,5	5,2	3,6	3,2
MyOP	—	—	1,2	0,9	—	—
OOO	2,2	1,7	2,2	2,0	16,5	13,4
StOL	2,5	2,4	0,8	1,7	1,7	1,9
POO	5,2	5,2	14,9	11,7	18,4	18,1
PStL	1,4	1,4	0,3	1,1	1,1	1,2
POP	9,6	8,3	20,7	15,9	14,3	10,6
PPP	7,4	5,0	5,5	4,0	5,4	2,1
StOO	—	—	—	—	—	2,5
PStO	2,3	1,9	3,4	2,8	1,5	2,2
PPSt	1,3	1,0	0,7	0,4	0,7	0,3
StStO	1,4	0,1	0,4	0,3	0,3	0,2
Espèces de triglycérides						
GS ₃	8,7	6,0	6,2	4,4	5,7	2,4
GS ₂ I	16,9	16,5	30,5	26,2	20,8	17,4
GS ₁ I ₂	31,2	37,3	24,0	34,7	25,7	41,6
GI ₃	43,2	40,2	39,3	34,7	43,8	38,6

palme/*Myrianthus* 60/40 et palme/colza 40/60 sont appauvris en acides gras saturés (53,4 % et 72,4 % contre 32,7 %, 32,9 % et 26,8 % respectivement) mais enrichis en acides gras insaturés (46,6 % et 27,6 % contre 67,3 %, 67,1 % et 73,2 % respectivement) ;

— en particulier, alors que l'huile de palme ne renferme que 8,3 % molaires d'acide linoléique (18:2, n-6) et le concret de palme 2,6 % molaires de ce même acide gras, précurseur de l'acide grammalinoléique (18:3, n-6), les couples d'huiles concret/soja 30/70, palme/*Myrianthus* 60/40 et palme/colza 40/60 sont caractérisés par le taux respectif en cet acide de 36,5 %, 41,7 % et 19,2 % molaires.

De plus, l'interestérisation étant régiosélective 1-3, la proportion en acides gras insaturés en position β est accrue dans les mélanges interestérisés.

* Analyse des triglycérides des mélanges.

Les triglycérides des mélanges palme/colza 40/60, concret/soja 30/70 et palme/*Myrianthus* 60/40 avant et après interestérisation pour des temps de contact respectifs de 4 h et 5 h sont analysés par HPLC ; la composition des triglycérides (Tabl. IX) montre que :

— l'I.R. 1-3 appauvrit les mélanges traités en triglycérides trisaturés (GS₃), disaturés (GS₂I) et dans certains cas en triglycérides triinsaturés (GI₃), mais les enrichit en triglycérides diinsaturés (GSI₂), les symboles S et I signifiant respectivement acide gras saturé et acide gras insaturé.

Partant de ces observations, nous proposons de définir un facteur « F », indépendant de la température comme étant l'indice de fluidité d'une huile ou d'un mélange d'huile [11]. « F » est calculé selon l'équation suivante :

$$F = GI_3 + GSI_2/GS_3 + GS_2I.$$

« F » est calculé pour 3 mélanges avant et après interestérisation. Ces valeurs sont consignés dans le tableau X ; elles indiquent comme il fallait s'y attendre que l'I.R. 1-3 améliore la fluidité des coupages.

TABLEAU X. — « F » avant et après interestérisation

	Concret/soja (30/70)		Palme/ <i>Myrianthus</i> (60/40)		Palme/colza (40/60)	
	T ₀	T ₅	T ₀	T ₅	T ₀	T ₄
« F »	2,91	3,44	1,72	2,27	2,77	4,05

La différence $\Delta F = F_t - F_0$ où F_t caractérise le mélange interestérisé pendant le temps de séjour t dans le réacteur et F_0 caractérise le mélange non traité, apparaît alors comme une mesure de l'efficacité de l'I.R. 1-3 pour un couple d'huiles défini.

ΔF dépend de plusieurs facteurs tels que : la nature du couple d'huiles, le rapport huile/contre-huile et la durée t de l'I.R. 1-3. $\Delta F/t$ caractérise ainsi l'efficacité du réacteur

3. — Essai d'obtention d'une base pour margarine enrichie en polyinsaturés.

Le couple palme/coprah 70/30 interestérisé en réacteur constitue une base grasse ayant des propriétés rhéologiques comparables à la margarine frigo-tartinable. Nous avons

essayer de concevoir la composition du mélange complexe pour l'obtention de base grasse pour margarine enrichie en polyinsaturés, en utilisant tous les types d'huiles ayant servi pour cette étude. Ce mélange renfermant 70 % d'huiles type palmitique, 20 % d'huiles lauriques et 10 % d'huiles fluides a la composition suivante :

palme (60 %) et concret (10 %), coprah (10 %) et palmiste (10 %), soja, colza, son de riz, bourrache et *Myrianthus arboreus* (2 % chacun).

La composition en acides gras totaux en % molaires de ce mélange, a la composition suivante :

$$\begin{aligned} 6:0 &= 0,2; & 8:0 &= 2,9; & 10:0 &= 1,6; & 12:0 &= 12,9; & 14:0 &= 5,1; \\ 16:0 &= 34,1; & 16:1 &= 0,2; & 18:0 &= 3,4; & 18:1 &= 27,9; & 18:2 &= 10,3, \\ 18:3(n-6) &= 0,4; & 18:3(n-3) &= 0,5; & 18:4 &= 0,1; & 20:0 &= 0,2; & 20:1 &= 0,2. \end{aligned}$$

Ce mélange est interestérisé en réacteur pour le temps de séjour de 4 h, soit pour un débit de $4,4 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$.

Le tableau XI donne les teneurs en solides en fonction de la température de ce mélange avant (T_0) et après (T_4) interestérisation

TABLEAU XI. — Teneurs en solide en fonction de la température du mélange complexe avant et après interestérisation

Température (°C)	Teneurs en solide (%)	
	mélange avant interestérisation	mélange après interestérisation
0	45,47	42,51
5	36,15	32,44
10	19,33	14,67
15	10,58	8,25
22	6,66	4,67
29	3,67	2,52
37	2,68	0,10
42	1,42	—
48	—	—

Ces résultats montrent que :

— le mélange interestérisé constitue une base grasse ayant des teneurs en solide comparables à celles de la margarine au tournesol ; la teneur en solide à 29 °C est de 2,52 % alors que celle pour la margarine au tournesol est de 3,22 % à cette même température. Cependant, le taux de solide à 37 °C est de 0,1 %, ce qui est négligeable et qui pourrait être évité en incorporant un peu plus de palmiste ou de coprah au mélange,

— le produit interestérisé renferme 60,4 % d'acides gras saturés et 39,6 % d'insaturés. Parmi les acides gras saturés, 17,6 % sont des acides gras à chaîne courte (C6:0 à C12:0), ce qui est intéressant sur le plan nutritionnel. Parmi les acides gras insaturés, 11,3 % sont des polyinsaturés.

Cette base grasse est donc utilisable comme ingrédient pour la production de margarine enrichie en polyinsaturés propriétés rhéologiques seraient comparables à celle de la margarine au tournesol : bonne tartinabilité, fusion totale dans la bouche et résistance à l'oxydation.

L'enrichissement en polyinsaturés et par voie de conséquence en acides gras essentiels peut être établi à l'avance en

modulant plus ou moins l'apport en huiles riches en ces acides : bourrache, *Myrianthus*, soja, colza et son de riz

CONCLUSION

La valorisation biologique de l'huile de palme et de sa fraction concrète par interestérification en réacteur tubulaire à lit catalytique fixe, garni de Lipozyme, présente par rapport à la réaction en « batch » utilisant le même catalyseur, l'avantage d'une transformation enzymatique continue, ce qui permet de disposer d'une meilleure flexibilité quant à l'obtention de produits aux propriétés définies.

L'étude de la cinétique de la réaction montre que la transformation est complète au terme de 5 h de temps de séjour dans le réacteur, ce qui correspond à un débit de $3,5 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$. Pour un couple d'huiles donné avec un rapport huile/contre-huile défini, l'établissement d'une cinétique montre qu'il est possible de façonner des produits dont chacun a des propriétés rhéologiques définies en fonction du débit au sein du réacteur.

Ainsi, dans le cas de l'I.R. 1-3 entre l'huile de palme ou le concret de palme et les huiles lauriques, le couple concret/palmiste (30/70) interestérifié pour des temps de propriétés rhéologiques comparables d'une part à une margarine ferme et d'autre part, à une margarine frigo tartinable ; les teneurs en solide respectives à 30 °C sont de 5,33 % et 2,67 %. L'interestérification avec les huiles fluides permet d'obtenir soit des graisses plastiques, soit des huiles pratiquement fluides à 20 °C.

L'interestérification entre l'huile de palme ou le concret de palme et l'huile de colza mériterait une étude plus détaillée en réacteur tubulaire. Ce procédé permettrait de valoriser les deux huiles ; le mélange interestérifié peut être une huile fluide à température ambiante ou une graisse plastique plus stable avec un taux d'acide α -linoléique réduit à une valeur de l'ordre de 2-3 %. L'avantage de ce procédé sur l'hydro-

génation serait de ne provoquer aucune isomérisation tant géométrique que de position au niveau des doubles liaisons. Il est en effet connu que les catalyseurs d'hydrogénation sont générateurs d'isomères et donc d'espèces chimiques nouvelles formées aux dépens des acides insaturés.

Nous avons pu aussi concevoir une base grasse, enrichie en polyinsaturés, pour margarine, présentant des propriétés rhéologiques de la margarine au tournesol.

L'interestérification étant régiosélective 1-3, les bases grasses ainsi que les huiles fluides obtenues présentent comparativement à l'huile de palme et à sa fraction concrète, une meilleure biodisponibilité des acides gras essentiels car ces derniers occupent principalement la position interne des triglycérides. Ces produits satisfont ainsi à la fois les besoins technologiques et nutritionnels. La conception des bases grasses pour margarines de table ou de pâtisserie par l'I.R. 1-3 inter-huiles est un procédé digne d'intérêt car il évite l'utilisation des huiles fluides hydrogénées donc chimiquement modifiées. Partant des substrats naturels ou succintement raffinés chimiquement, il est ainsi possible de façonner des margarines « garanties sans huiles hydrogénées ».

Cependant, comme nous l'avons déjà signalé, le biocatalyseur utilisé, le Lipozyme, est très coûteux. L'utilisation de cellules entières devrait être une solution prometteuse, en ce sens que sur les plans technique et économique, elles sont plus faciles à produire que la lipase elle-même, cette dernière nécessitant les processus de précipitation et de purification diverses. De plus, avec les cellules entières on dispose en fait d'une lipase fixée, naturellement ; d'autre part on peut aisément confiner des cellules, soit simplement en mélange avec un support minéral inerte comme la silice, soit dans un réticulum convenable [12, 13]. Sur le plan économique, un réacteur à lit fixe constitué de cellules confinées serait bien meilleur marché qu'un réacteur à lit fixe composé d'une lipase fixée dont les deux facteurs limitant sont essentiellement le coût de production du biocatalyseur et la durée de vie.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] FAULKNER M., BONFAND A. et NAUDET M. (1978). — Comparaisons comparées d'huile de palme provenant de différentes espèces de palmiers du genre *Elaeis*. *Rev. fr. Corps Gras*, **25**, p. 125-133.
- [2] MUDERHWA J. M., RATOMAHENINA R., PINA M., GRAILLE J. and GALZY P. (1985). — Purification and properties of the lipase from *Candida deformans* (Zach) Langeron and Guerra. *J. am. Oil Chem. Soc.*, **62**, p. 1031-1036.
- [3] MUDERHWA J. M., RATOMAHENINA R., PINA M., GRAILLE J. and GALZY P. (1986). — Purification and properties of the lipases from *Rhodotorula pilimanae* Hedrick and Burk. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, p. 348-354.
- [4] MUDERHWA J. M., PINA M. et GRAILLE J. (1987). — Problème du dosage des acides gras en positions internes et externes des triglycérides des huiles lauriques, approche de la spécificité des lipases vis-à-vis de la nature des acides gras. *Rev. fr. Corps Gras*, **34**, p. 533-541.
- [5] MUDERHWA J. M., DHUIQUE-MAYER C., PINA M., GALZY P., GRIGNAC P. et GRAILLE J. (1987). — Répartition interne/externe des acides gras des triglycérides de quelques huiles gamma linoléiques. *Oléagineux*, **42**, p. 207-211.
- [6] MUDERHWA J. M., PINA M. et GRAILLE J. (1988). — Aptitude à la transestérification de quelques lipases régiosélectives 1-3 I. — Détermination de l'activité spécifique de transestérification — Comparaison entre interestérification et hydrolyse dans l'action des lipases. *Oléagineux*, **43**, N° 10, p. 385-392.
- [7] GRAILLE J., MUDERHWA J. M. and PINA M. (1987). — A method for determination of interesterification activity of biocatalysts. *Fat Science Technology*, **89**, p. 224-226.
- [8] MUDERHWA J. M., PINA M. et GRAILLE J. (1988). — Aptitude à la transestérification de quelques lipases régiosélectives 1-3. II. — Taux de conversion et glycérides partiels en fonction de l'activité de l'eau des biocatalyseurs. *Oléagineux*, **43**, N° 11, p. 427-433.
- [9] MUDERHWA J. M., PINA M. et GRAILLE J. (1988). — Aptitude à la transestérification de quelques lipases régiosélectives 1-3. III. — Stabilité de la régiosélectivité 1-3. *Oléagineux*, **43**, N° 12, p. 465-470.
- [10] HANSEN T. T. and EIGTVED P. (1985). — In: *Proceeding of the World Conference on Emerging Technologies in the Fats and Oils Industry*, p. 365-369. Cannes (France), Ed. by BALDWIN A. R., Am. Oil Chem. Soc., Printed in U.S.A.
- [11] MUDERHWA J. M., PINA M. et GRAILLE J. (1988). — Interestérification catalysée par les lipases régiosélectives 1-3 en milieu fondu. Valorisation de l'huile de palme et de sa fraction concrète. *Rev. fr. Corps Gras*, **35** (soumis à publication).
- [12] GRAILLE J., PINA M. et MONTET D. (1988). — Biotechnologie des lipides : quelques applications possibles. *La Rivista Italiana della Sostanze Grasse*, **65**, p. 423-428.
- [13] GRAILLE J., PINA M. et MONTET D. (1988). — Biotechnologie des lipides : quelques applications possibles. *Oléagineux*, **43**, N° 4, p. 181-190.

SUMMARY

1-3 regioselective enzymatic interesterification in a melted medium and a continuous reactor : valorization of palm oil.

J. M. MUDERHWA, M. PINA, D. MONTET, P. FEUILLARD and J. GRAILLE, *Oléagineux*, 1989, **44**, N° 1, p. 35-43

The application of 1-3 regioselective enzymatic interesterification in a tubular reactor with a fixed catalyst bed filled with Lipozyme (*Mucor miehei* fixed lipase), follows on from development of the batch reaction, it forms the final stage in the study of vegetable oil biomanufacture by enzymatic interesterification in a melted medium catalyzed by 1-3 regioselective lipases. Reaction kinetics reveal complete transformation within 5 hours in the reactor, along with conservation of 1-3 regioselectivity. It is possible to start from palm oil/counter oil blends in a defined ratio and manufacture products whose properties depend on reactor output and the composition of the initial blend; the properties of the product can therefore be varied at will. The aim, which is to valorize oil palm, or its solid fraction, by obtaining either fat bases for margarines without hydrogenated oils, or for liquid oils for seasoning and frying, was achieved.

RESUMEN

Interesterificación enzimática regioselectiva 1-3 en medio derretido y en reactor continuo : haciendo resaltar las cualidades del aceite de palma.

J. M. MUDERHWA, M. PINA, D. MONTET, P. FEUILLARD y J. GRAILLE, *Oléagineux*, 1989, **44**, N° 1, p. 35-43.

La interesterificación enzimática regioselectiva 1-3 en un reactor tubular de lecho catalítico fijo lleno de Lipozyme (lipasa fijada de *Mucor miehei*) se realiza después de haberse desarrollado la reacción en discontinuo, y constituye la etapa final del estudio de la biolaboración de aceites vegetales por interesterificación enzimática en medio derretido catalizada por las lipasas regioselectivas 1-3. La cinética de la reacción muestra una transformación completa a las 5 horas de permanencia en el reactor, conservándose la regioselectividad 1-3. A partir de mezclas de aceite de palma con otro aceite, dentro de una relación determinada, se puede elaborar productos cuyas propiedades dependen del caudal del reactor y de la composición de la mezcla inicial; o sea que se puede hacer variar como se quiera las propiedades de los productos. La meta que consiste en hacer resaltar las cualidades del aceite de palma o de su fracción concreta mediante la obtención, ya sea de bases grasas para margarinas sin aceites hidrogenados, o de aceites fluidos para aliño y freimiento, ha logrado cumplirse.



Le 10ème Salon International
de l'Industrie de l'Alimentation Animale et
des Industries apparentées aura lieu à
Jaarbeurs/Utrecht/Pays Bas

les 23-24-25-26 Mai 1989

**Le Victam est le plus grand salon
international de l'industrie de l'alimentation
animale et des industries apparentées**

Industrie de l'alimentation animale, Meunerie, Industrie sucrière,
Décorticage, Traitement des oléagineux, Féculerie, Equanssage, Traitement
des céréales, Aliments d'alimentation, Aliments pour animaux familiers,
Aliments pour poissons, Fabrication des farines de poissons, Déshydratation,
Manutention et Stockage

Matériels exposés Matériels et produits pour l'industrie:
Automation, Systèmes d'optimisation pour la
production à moindre coût des aliments
composés, matières premières et additifs

Importance 350 exposants de 30 pays différents
15.000 visiteurs du monde entier

Surface 30.000 m²

Symposium Un important symposium se déroulera durant
l'exposition (24-25 Mai) sur le thème 'La
flexibilité, un impératif pour notre industrie face
à l'évolution des marchés'

Organisateur **VICTAM INTERNATIONAL**
B p. 1103, 2302 BC LEIDEN, Pays Bas
téléphone 71-768603, télécopie 71-317554,
téléc 39103 Victa NL
Directeur: Piet Schrama